

## ARTICULAR DISEASE THERAPEUTIC AGENT

Publication number: JP2003089647

Publication date: 2003-03-28

Inventor: SERIZAWA ISAO; MAEKAWA TAKATSUGU; ILLES JANOS; NESZMELI ERZSEBET

Applicant: TAKADA SEIYAKU KK; RICHTER GEDEON VEGYESZET

Classification:

- international: A61K31/00; A61K31/715; A61K31/726; A61K31/728; A61K33/30; A61K47/48; A61P19/00; A61P19/02; A61P27/00; A61P27/02; A61P29/00; A61P35/00; A61P35/04; A61P43/00; A61K31/00; A61K31/715; A61K31/726; A61K33/30; A61K47/48; A61P19/00; A61P27/00; A61P29/00; A61P35/00; A61P43/00; (IPC1-7): A61K31/728; A61K33/30; A61P19/02; A61P27/02; A61P29/00; A61P35/00; A61P35/04; A61P43/00

- european: A61K33/30; A61K47/48K8

Application number: JP19990063718 19990310

Priority number(s): JP19990063718 19990310

Also published as:



EP1166788 (A1)  
WO0053194 (A1)  
US6608043 (B1)  
EE200100478 (A)  
CA2364451 (A1)

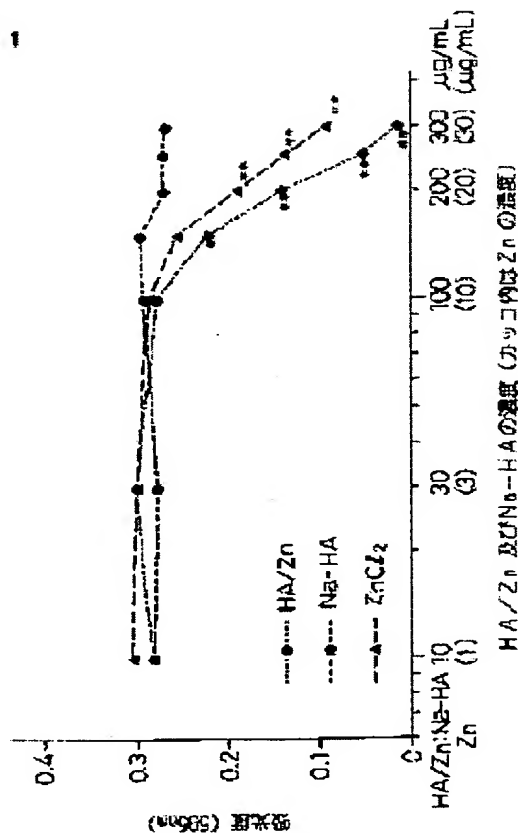
more &gt;&gt;

Report a data error he

## Abstract of JP2003089647

**PROBLEM TO BE SOLVED:** To obtain a new articular disease therapeutic agent. **SOLUTION:** This therapeutic agent includes a complex of hyaluronic acid with zinc as an active ingredient and is applied to articular diseases, for example, chronic rheumatoid arthritis. The complex synergistically inhibits the proliferation of synovial cells to suppress a histoclastic enzyme MMP-9 produced by the synovial cells in comparison with the cases of single application of hyaluronic acid or zinc.

図 1



Data supplied from the esp@cenet database - Worldwide

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号  
特開2003-89647  
(P2003-89647A)

(43) 公開日 平成15年3月28日 (2003.3.28)

(51) Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テマコード <sup>*</sup> (参考)
A 6 1 K 31/728		A 6 1 K 31/715	6 1 1 4 C 0 8 6
A 6 1 P 19/02		31/00	6 1 9 A
27/02			6 2 7 A
29/00			6 2 9 A
35/04			6 3 5 B
審査請求 未請求 請求項の数39 O L (全 7 頁) 最終頁に続く			

(21) 出願番号	特願平11-63718	(71) 出願人	000169880 高田製薬株式会社 東京都台東区烏越2丁目13番10号
(22) 出願日	平成11年3月10日 (1999.3.10)	(71) 出願人	591180314 リヒター ゲデオン ベジェセティ ジャ ール アール. テー. ハンガリー国, 1475 ブダベスト, ジョム ロイ ウート 19-21
		(72) 発明者	芹沢 功 埼玉県大宮市飯田110番の53
		(74) 代理人	100077517 弁理士 石田 敬 (外4名)
		最終頁に続く	

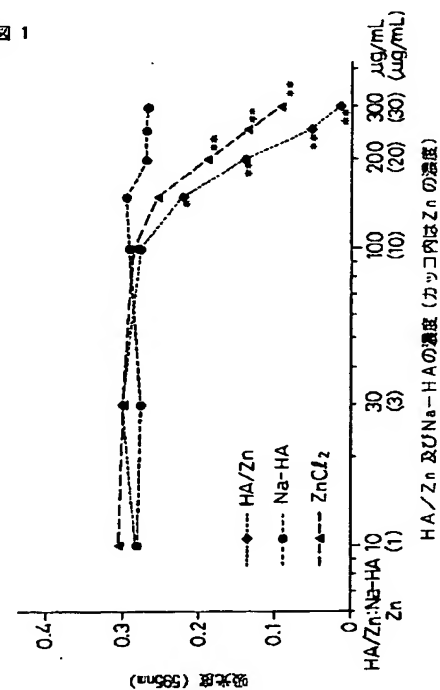
(54) 【発明の名称】 関節性疾患治療剤

(57) 【要約】

【課題】 新規な関節性疾患治療剤の提供。

【解決手段】 ヒアルロン酸と亜鉛との複合体（会合物）を活性成分とする関節性疾患、例えば慢性関節リウマチ、に対する治療剤を提供する。この複合体は、その構成成分であるヒアルロン酸及び亜鉛単独に比較して、相乗的に、滑膜細胞の増殖を阻害し、滑膜細胞により産生される組織破壊酵素MMP-9を抑制する。

図 1



## 【特許請求の範囲】

【請求項 1】 ヒアルロン酸と亜鉛との複合体を含んで成る、関節性疾患治療剤。

【請求項 2】 前記ヒアルロン酸と亜鉛との複合体（会合物）が約 100kD～約 2,000kD の分子量を有する、請求項 1 に記載の関節性疾患治療剤。

【請求項 3】 前記ヒアルロン酸と亜鉛との複合体（会合物）が約 1,000kD の分子量を有する、請求項 2 に記載の関節性疾患治療剤。

【請求項 4】 ヒアルロン酸と亜鉛との重量比が 5 : 1 ～ 20 : 1 である請求項 1 ～ 3 のいずれか 1 項に記載の関節性疾患治療剤。

【請求項 5】 ヒアルロン酸と亜鉛との重量比が約 10 : 1 である、請求項 4 に記載の関節性疾患治療剤。

【請求項 6】 前記関節性疾患が、慢性関節リウマチ、変形性関節症、関節水症又は急速性破壊型股関節症である、請求項 1 ～ 5 のいずれか 1 項に記載の関節性疾患治療剤。

【請求項 7】 前記関節性疾患が慢性関節リウマチである、請求項 6 に記載の関節性疾患治療剤。

【請求項 8】 ヒアルロン酸と亜鉛との複合体を含んで成る、組織破壊酵素 MMP-9 抑制剤。

【請求項 9】 前記ヒアルロン酸と亜鉛との複合体（会合物）が約 100kD～約 2,000kD の分子量を有する、請求項 8 に記載の組織破壊酵素 MMP-9 抑制剤。

【請求項 10】 前記ヒアルロン酸と亜鉛との複合体（会合物）が約 1,000kD の分子量を有する、請求項 9 に記載の組織破壊酵素 MMP-9 抑制剤。

【請求項 11】 ヒアルロン酸と亜鉛との重量比が 5 : 1 ～ 20 : 1 である請求項 8 ～ 10 のいずれか 1 項に記載の組織破壊酵素 MMP-9 抑制剤。

【請求項 12】 ヒアルロン酸と亜鉛との重量比が約 10 : 1 である、請求項 11 に記載の組織破壊酵素 MMP-9 抑制剤。

【請求項 13】 前記組織破壊酵素 MMP-9 抑制剤が、インスリン依存性増殖糖尿病網膜症治療剤、又は悪性腫瘍浸潤もしくは転移に対する抑制剤である請求項 8 ～ 12 のいずれか 1 項に記載の組織破壊酵素 MMP-9 抑制剤。

【請求項 14】 関節性疾患治療剤の製造のための、ヒアルロン酸と亜鉛との複合体の使用。

【請求項 15】 前記ヒアルロン酸と亜鉛との複合体（会合物）が約 100kD～約 2,000kD の分子量を有する、請求項 14 に記載の使用。

【請求項 16】 前記ヒアルロン酸と亜鉛との複合体（会合物）が約 1,000kD の分子量を有する、請求項 15 に記載の使用。

【請求項 17】 ヒアルロン酸と亜鉛との重量比が 5 : 1 ～ 20 : 1 である、請求項 14 ～ 16 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 18】 ヒアルロン酸と亜鉛との重量比が約 10 : 1 である、請求項 17 に記載の使用。

【請求項 19】 前記関節性疾患が慢性関節リウマチ、変形性関節症、関節水症又は急速性破壊型股関節症である、請求項 14 ～ 18 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 20】 前記関節性疾患が慢性関節リウマチである、請求項 19 に記載の使用。

【請求項 21】 組織破壊酵素 MMP-9 抑制剤の製造のための、ヒアルロン酸と亜鉛との複合体の使用。

【請求項 22】 前記ヒアルロン酸と亜鉛との複合体（会合物）が約 100kD～約 2,000kD の分子量を有する、請求項 21 に記載の使用。

【請求項 23】 前記ヒアルロン酸と亜鉛との複合体（会合物）が約 1,000kD の分子量を有する、請求項 22 に記載の使用。

【請求項 24】 ヒアルロン酸と亜鉛との重量比が 5 : 1 ～ 20 : 1 である、請求項 21 ～ 23 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 25】 ヒアルロン酸と亜鉛との重量比が約 10 : 1 である、請求項 24 に記載の使用。

【請求項 26】 前記組織破壊酵素 MMP-9 抑制剤が、インスリン依存性増殖糖尿病網膜症治療剤、又は悪性腫瘍浸潤もしくは転移に対する抑制剤である請求項 21 ～ 25 のいずれか 1 項に記載の使用。

【請求項 27】 関節性疾患を有する患者に、ヒアルロン酸と亜鉛との複合体（会合物）を投与することを特徴とする、関節性疾患の治療方法。

【請求項 28】 前記ヒアルロン酸と亜鉛との複合体（会合物）が約 100kD～約 2,000kD の分子量を有する、請求項 27 に記載の治療方法。

【請求項 29】 前記ヒアルロン酸と亜鉛との複合体（会合物）が約 1,000kD の分子量を有する、請求項 28 に記載の治療方法。

【請求項 30】 ヒアルロン酸と亜鉛との重量比が 5 : 1 ～ 20 : 1 である、請求項 27 ～ 29 のいずれか 1 項に記載の治療方法。

【請求項 31】 ヒアルロン酸と亜鉛との重量比が約 10 : 1 である、請求項 30 に記載の治療方法。

【請求項 32】 前記関節性疾患が慢性関節リウマチ、変形性関節症、関節水症又は急速性破壊型股関節症である、請求項 27 ～ 30 のいずれか 1 項に記載の治療方法。

【請求項 33】 前記関節性疾患が慢性関節リウマチである、請求項 32 に記載の治療方法。

【請求項 34】 組織破壊酵素 MMP-9 の産生が亢進する疾患を有する患者に、ヒアルロン酸と亜鉛との複合体を投与することを特徴とする、組織破壊酵素 MMP-9 の生産亢進を抑制する方法。

【請求項 35】 前記ヒアルロン酸と亜鉛との複合体（会合物）が約 100kD～約 2,000kD の分子量を有

する、請求項34に記載の方法。

【請求項36】 前記ヒアルロン酸と亜鉛との複合体（会合物）が約1,000kDの分子量を有する、請求項35に記載の方法。

【請求項37】 ヒアルロン酸と亜鉛との重量比が5:1~20:1である、請求項34~36のいずれか1項に記載の方法。

【請求項38】 ヒアルロン酸と亜鉛との重量比が約10:1である、請求項37に記載の方法。

【請求項39】 前記組織破壊酵素MMP-9抑制剤が、インスリン依存性増殖糖尿病網膜症治療剤、及び悪性腫瘍浸潤もしくは転移に対する抑制剤である請求項34~38のいずれか1項に記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【発明の属する技術分野】本発明は、慢性関節リウマチ等の関節性疾患治療剤に関する。

【0002】

【従来の技術】慢性関節リウマチ、変形性関節症、外傷性関節炎等を含む関節性疾患は、関節滑膜の炎症を介して軟骨や骨の破壊を惹起する炎症性疾患である。炎症滑膜には、血管新生、リンパ球浸潤、並びに滑膜細胞の増殖及び活性化が認められる。活性化した滑膜細胞はサイトカイン、プロスタグランジン、組織破壊酵素などのケミカルメディエーターを産生し、軟骨や骨の破壊を惹起すると考えられている（Harris, E. D., New England Journal of Medicine, Vol.322, p.1277-1289, (1990); Cash, J. M., et. al., New England Journal of Medicine, Vol.330, p.1368-1375 (1994)）。

【0003】関節性疾患の治療のために、一般にナトリウム塩の型のヒアルロン酸が有効であることが知られている（文献：山本真他“高分子ヒアルロン酸ナトリウム（NRD101）の変形性膝関節症に対する臨床評価”、薬理と治療、Vol.21, No.3, p.894-970, 1999）。また、亜鉛が関節炎の治療のために有効であることが知られている（A. Frigo et al., "Copper and Zinc in Inflammation", Inflammation and drug therapy series, Vol.IV, Kluwer Academic Publishers, p.133-142 (1989)）。しかしながら、ヒアルロン酸（一般に、ナトリウム塩の形で）は、その生物適合性（biocompatibility）及び流動特性が好都合であるために若干の関節性疾患の治療のために知られているが、滑膜細胞の増殖や活性化に対する抑制効果は実質的に有しない。また、亜鉛の使用においても満足すべき治療効果は得られていない。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】従って、本発明は、慢性関節リウマチなどの関節性疾患の発症機作を構成する滑膜細胞の増殖及び活性化、特に組織破壊酵素の抑制を介して関節性疾患を効果的に治療することができる医薬

組成物並びにその製造及び使用を提供しようとするものである。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者らは、上記の課題を解決すべく種々検討した結果、ヒアルロン酸（ナトリウム塩）は滑膜細胞の増殖及び活性化に対する抑制効果をほとんど有さず、また亜鉛の滑膜細胞の増殖及び活性化に対する抑制、特に組織破壊酵素に対する抑制効果は非常に低いものに対して、ヒアルロン酸と亜鉛との複合体（会合物）は、両構成成分の相乗作用すなわち増強相乗作用又は相互作用により、非常に強力な滑膜細胞増殖抑制作用及び組織破壊酵素抑制作用を有するという驚くべき事実を見出し、本発明を完成させた。

【0006】従って本発明は、ヒアルロン酸と亜鉛との複合体（会合物）を含んで成る関節性疾患治療剤を提供する。本発明はまた、ヒアルロン酸と亜鉛との複合体（会合物）を含んで成る組織破壊酵素MMP-9抑制剤を提供する。本発明はまた、関節性疾患治療剤の製造のための、ヒアルロン酸と亜鉛との複合体（会合物）の使用に関する。

【0007】本発明はさらに、組織破壊酵素MMP-9抑制剤の製造のための、ヒアルロン酸と亜鉛との複合体（会合物）の使用に関する。本発明はさらに、関節性疾患を有する患者に、ヒアルロン酸と亜鉛との複合体（会合物）を投与することを特徴とする関節性疾患の治療方法を開示する。本発明はさらに、組織破壊酵素MMP-9の産生が亢進している患者に、ヒアルロン酸と亜鉛との複合体（会合物）を投与することを特徴とする、組織破壊酵素MMP-9の生産亢進を抑制する方法を開示する。

【0008】

【発明の実施の形態】本発明の活性成分は、ヒアルロン酸と亜鉛との複合体（会合物）である。ヒアルロン酸は通常ナトリウム塩として存在し、Meyerら、J. Biol. Chem. Vol.107, p.629 (1934)により記載された巨大分子である。ヒアルロン酸は、 $\beta$ 1,3-グルクロン酸成分と $\beta$ 1,4-グルコサミン成分とを交互に有する高粘性グルコサミノグリカンであり、その分子量は50kD~数百万Dである。ヒアルロン酸はすべての哺乳類の結合組織に見出され、皮膚、目のガラス体、滑液、臍帯及び軟骨組織に高レベルで存在する。ヒアルロン酸は結合組織の基礎的な成分であるため、生物適合性であり、生物吸着性であり、且つ免疫原性でない。このため、ヒアルロン酸は、関節軟骨の潤滑性及び保護のごとき多くの生物学的機能を演じている。

【0009】本発明のヒアルロン酸と亜鉛との複合体（会合物）において、ヒアルロン酸と亜鉛との比率は、これらの成分が、滑膜細胞の増殖及び組織破壊酵素MMP-9抑制について相乗的作用を発揮する範囲であり、重量比として、ヒアルロン酸：亜鉛が5:1~20:1

の範囲であり、好ましくは約10:1である。本発明において使用するヒアルロン酸と亜鉛との複合体の分子量は好ましくは100kD~2,000kDであり、約1000kDの分子量が好ましい。本発明の、ヒアルロン酸と亜鉛との複合体（会合物）は、例えばヒアルロン酸ナトリウムの水溶液と亜鉛塩、例えば塩化亜鉛の水溶液とを混合することにより製造することができる（ヨーロッパ特許明細書No. EP 0413016）。

【0010】多くの炎症性関節性疾患が、なんらかの原因による滑膜細胞の増殖と活性化により惹起されると考えられている。活性化された滑膜細胞はサイトカイン、プロスタグランジン、組織破壊酵素などのケミカルメディエーターを産生し、軟骨や骨の破壊を引き起こし、関節の炎症を生じさせる。組織破壊酵素（matrix metalloproteinase (MMP)）には、I型コラーゲン及びII型コラーゲンを分解するMMP-1、これらのコラーゲンに加えてさらに軟骨型プロテオグリカンをも分解するMMP-3、I型又はII型コラーゲンのゼラチン化したものをさらに低分子型コラーゲンに分解し、IV型コラーゲン、V型コラーゲン、XI型コラーゲン及び軟骨型プロテオグリカンを分解するMMP-9（Sapata, I., et al., Biochem. Biophys. Acta. Vol. 370, p. 510-523, 1974; Murphy, G. et al., Biochem. J. Vol. 203, p. 209-221, 1982; Morel, F., et al., Biochem. Biophys. Res. Commun. Vol. 191, p. 269-274, 1993; Hibbs, M. S., Matrix Suppl. Vol. 1, p. 51-57, 1992; Murphy, G. et al., Biochem. J. Vol. 277, p. 277-279, 1991; Hibbs, M. S., et al., J. Biol. Chem. Vol. 260, p. 2493-2500, 1995）等が含まれ、これらが関節破壊に関与するものと考えられる。

【0011】慢性関節リウマチ、変形性関節症、及び外傷患者からの滑膜細胞はインビトロにおいて増殖するが、これらの滑膜細胞の増殖が100~300 µg/mlの濃度の本発明のヒアルロン酸／亜鉛複合体により濃度依存的に阻害される。従って、本発明のヒアルロン酸／亜鉛複合体は、慢性関節リウマチ、変形性関節症、外傷性関節疾患、関節水症、急速性破壊型股関節症等の関節性疾患の治療のために有用である。滑膜細胞の増殖を阻害することができれば慢性関節リウマチの対症的な治療が可能であると考えられる（Jae Unexcad Pats Publication No. 7-145062）。

【0012】慢性関節リウマチ、変形性関節症、及び外傷患者からの滑膜細胞のインビトロ培養において、慢性関節リウマチ由来の滑膜細胞からの組織破壊酵素MMP-9は100 µg/ml以下の本発明のヒアルロン酸／亜鉛複合体（会合物）により抑制される。従って、本発明のヒアルロン酸／亜鉛複合体（会合物）は、慢性関節リウマチにおける滑膜細胞からの組織破壊酵素MMP-9抑制剤として有用である。ここで、前記組織破壊酵素MMP-9抑制剤は、例えば、インスリン依存性増殖糖尿病

網膜症治療剤、又は悪性腫瘍浸潤もしくは転移に対する抑制剤である。

【0013】実施例において示すごとく、ヒアルロン酸ナトリウムは、滑膜細胞の増殖を実質的に阻害せず、また組織破壊酵素MMP-9を実質的に抑制しない。また、亜鉛塩は、滑膜細胞の増殖を阻害し、且つ組織破壊酵素MMP-9を抑制するが、本発明のヒアルロン酸／亜鉛複合体（会合物）は亜鉛塩より強力に滑膜細胞の増殖を阻害し、且つ組織破壊酵素MMP-9を抑制する。このことは、上記の効果の場合に増強相乗作用を示すことを意味する。

【0014】本発明のヒアルロン酸／亜鉛複合体（会合物）としては、通常医薬品で行われている投与方法を用いることができる。すなわち経口投与及び非経口投与が可能であり、注射により投与するのが特に好ましい。本発明のヒアルロン酸／亜鉛複合体（会合物）の有効投与量は1人1回各関節当り、0.01g~1mg、好ましくは0.03mg~0.5mgである。本発明のヒアルロン酸／亜鉛複合体（会合物）は、物理的最大の投与量200mg/kgでラット及びマウスに皮下投与しても、全身性の毒性症状は認められなかった。

【0015】本発明の関節性疾患治療剤及び組織破壊酵素MMP-9抑制剤は、常用の医薬キャリアーと共に、本発明のヒアルロン酸／亜鉛複合体（会合物）を0.001%~1%、好ましくは0.01%~0.5%含有することができる。常用の医薬キャリアーとしては、例えば、キトサン、でんぷん、ペクチン、HPMC、アルギン酸ナトリウムなどの医療用に一般的に用いられる基剤、トラガント末、アラビアゴム、トウモロコシデンプン又はゼラチンのような結合剤、結晶セルロース、マンニトールのような賦形剤、トウモロコシデンプン、アルファ化デンプン、アルギン酸などのような崩壊剤、ステアリン酸マグネシウムのような潤滑剤、ショ糖、乳糖又はサッカリンのような甘味剤、ペパーミント、ハッカ油又はチェリーのような香味剤、防腐剤等が挙げられる。

【0016】

【実施例】次に、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。

#### 実施例1. 滑膜細胞増殖阻害作用

慢性関節リウマチ（RA）患者からの滑膜細胞（RAS C）、変形性関節症患者（OA）からの滑膜細胞（OAS C）及び外傷患者（TA）からの滑膜細胞（TAS C）の増殖に対する、本発明のヒアルロン酸と亜鉛との複合体（会合物）（HA/Zn）、並びに比較対照としてのヒアルロン酸ナトリウム塩（Na-HA）及び亜鉛（Zn）の影響を試験した。

【0017】被験物質としてHA/Zn（Lot. No. A65242、1%溶液、ゲデオン・リヒター社）、ヒアルロン酸ナトリウム（Na-HA; Lot. No. KK4001、キューピー）及び塩化亜鉛（Zn; Lot.

No. ESH1413、和光純薬工業)を使用した。上記HA/Zn溶液(比重;  $d_{20}^{20}=1.0134$ )に含まれるヒアルロン酸と亜鉛含量の定量値を予め求め、上記1%を100としてヒアルロン酸が99%(ヒアルロン酸ナトリウムとして換算した値は105.0%)、亜鉛が1.07mg/mLであったことから、当該HA/Zn中のヒアルロン酸と亜鉛の重量比を10:1(Na-HA:Zn)とみなした。被験物質の濃度はHA/Znについては10 $\mu$ g/mL、30 $\mu$ g/mL、100 $\mu$ g/mL、150 $\mu$ g/mL、200 $\mu$ g/mL、250 $\mu$ g/mL及び300 $\mu$ g/mLとし、Na-HAはHA/Znと同濃度とし、ZnはHA/Znの濃度の10分の1の濃度として、試験した。

【0018】滑膜組織は、慢性関節リウマチ(RA)患者(5例; 65.6 $\pm$ 10.6歳)及び変形性関節症(OA)患者(6例; 73.4 $\pm$ 8.9歳)の膝関節滑膜組織は人工関節置換術施工時に、また外傷(TA)患者(6例; 25.6 $\pm$ 6.7歳)の膝関節滑膜組織は関節鏡施工時に採取した。採取後、直ちにDMEM(Dulbecco's modified Eagle's medium)の入ったチューブ(50mL容遠沈管; IWAKI)に入れ、4℃で保管した。その後、クリーンベンチ内で滑膜組織を洗浄し、滑膜以外の組織を除去し、滑膜を細切し、そして酵素処理(コラゲナーゼ、トリプシン; 和光純薬工業)により滑膜細胞(SC)を単離させ試験に用いた。

【0019】SCの培養は全て10%の熱非動化(56℃、30分)したウシ胎児血清(FCS; 大日本製薬)及び抗生物質混液(ペニシリン100ユニット/mL、ストレプトマイシン100 $\mu$ g/mL、ファンギゾン(Fungizone)25ng/mL)を含むDMEMを用いて行った。

【0020】滑膜細胞(SC)をマイクロプレート(96ウェル; IWAKI)に3.55 $\times$ 10<sup>3</sup>細胞/0.1mL/ウェル(1 $\times$ 10<sup>4</sup>細胞/cm<sup>2</sup>)で播種し、5%CO<sub>2</sub>-95%airの気相中37℃にて2日間予備培養した。その後、種々の濃度に調製された前記薬物を含む培地に交換し、更に5%CO<sub>2</sub>-95%空気の気相中37℃にて薬物添加後12日目まで培養した。培養期間中の培地交換は、薬物が含まれた培地を4日毎に交換した。増殖能の測定は薬物添加後、4、8及び12日目に、MTT法<sup>4)</sup>(新化学実験講座12、分子免疫学I-免疫細胞・サイトカイン、358, 1989)により行った。結果は細胞数と正の相関を示す吸光度で表した。

【0021】統計解析はBartlett法による5%の有意水準で分散の一様性の検定を行った。分散が一様な場合は一元配置による分散分析(1way ANOVA)を行い、有意差が認められた場合はDunnett法あるいはTukey法にて平均値の多重比較検定を行った。分散が一様でない場合は、Kruskal-Wallisの検定を行い順位についてnon-parametricのDunnett法あるいはTukey法にて多重比較

検定を行った。RASC、OASC及びTASCについて得られた結果を、それぞれ図1、図2及び図3に示す。これらの図において、薬物無添加群に対して $p<0.05$ で有意差がある場合を「\*」で示し、 $p<0.01$ で有意差がある場合を「\*\*」で示す。

【0022】これらの図から明らかな通り、Na-HAを添加してもいずれの滑膜細胞の増殖も有意に阻害されなかったが、HA/Znの添加においては添加量依存的に、滑膜細胞の増殖の有意な阻害が生じた。またZnの添加においても添加量依存的に滑膜細胞増殖の有意な阻害が生じた。しかしながら、Znに比べてHA/Znの方が滑膜細胞増殖阻害が大きく、Na-HAにおいて有意な増殖阻害が生じないことを考慮すれば、HA/Znは、Na-HA及びZn単独使用の場合に比して相乗作用を有することが確認された。

#### 【0023】実施例2. 滑膜細胞培養上清中の組織破壊酵素MMP-9に対する抑制効果

滑膜細胞を培養ディッシュ( $\phi$ 35mm; IWAKI)に10 $\times$ 10<sup>4</sup>cells/2mL/dish(1 $\times$ 10<sup>4</sup>cells/cm<sup>2</sup>)で播種し、5%CO<sub>2</sub>-95%airの気相中37℃にて2日間予備培養した。その後、薬物を含んだ培地に置き換え、更に同条件下で8日間培養した培養上清を採取し、測定まで-80℃で保存した。HA/Zn及びNa-HAの添加濃度は100 $\mu$ g/mL(終濃度)とし、Znの濃度は10 $\mu$ g/mL(終濃度)となるようにした。

【0024】上清中の組織破壊酵素としてマトリックスメタロプロテイナーゼMMP-9をEIA法(Enzyme Immunoassay法)を用いて測定した。結果は培養上清中の濃度として算出されたものを細胞当たりで検討するため、この時点でのMTT法による培養細胞の吸光度値で割った値に換算した。また、この値をさらにコントロール(薬物非添加群)を100%として薬物添加群の個々の値をコントロールに対する相対値で表した。

【0025】その結果、対照(薬物無添加)を100%とした場合、MMP-9の産生は、HA/Zn添加では0%、Na-HA添加では100%、Zn添加では50%であった。この結果、HA/ZnのMMP-9抑制作用は、その構成成分であるNa-HA及びZn単独に対して相乗的であることが確認された。以上の通り、本発明のヒアルロン酸と亜鉛との複合体(会合物)は、その構成成分であるヒアルロン酸及びZnに比較して、相乗的に、滑膜細胞の増殖に対する阻害作用及び滑膜細胞により生産される組織破壊酵素MMP-9抑制作用を有し、慢性関節リウマチ等の関節性疾患の治療剤として有用である。

#### 【0026】実施例3.

処方

ヒアルロン酸亜鉛	0.2g
マンニトール	5.0g

# 注射用水 適量

全量 100ml

## 調整法

注射用水80mlにマンニトール又はブドウ糖を5g加えて溶かした後、さらに、ヒアルロン酸亜鉛を少量ずつ加えて攪拌溶解した。溶液をろ過して、アンプルに充填した。このアンプルをシャワー滅菌器(約105℃)により30分間滅菌して注射剤とした。同様に実施例4の処方についても、本法に準じた操作で調整した。

## 【0027】実施例4.

### 処方

ヒアルロン酸亜鉛 0.5g  
ブドウ糖 5.0g

# 注射用水 適量

全量 100ml

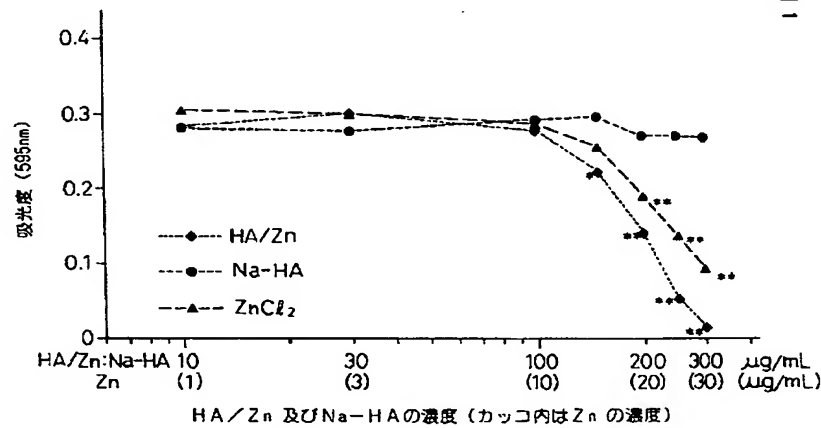
## 【図面の簡単な説明】

【図1】図1は、慢性関節リウマチ患者からの滑膜細胞(RASC)に対する、HA/Zn、Na-HA及びZnの増殖阻害効果を示すグラフである。

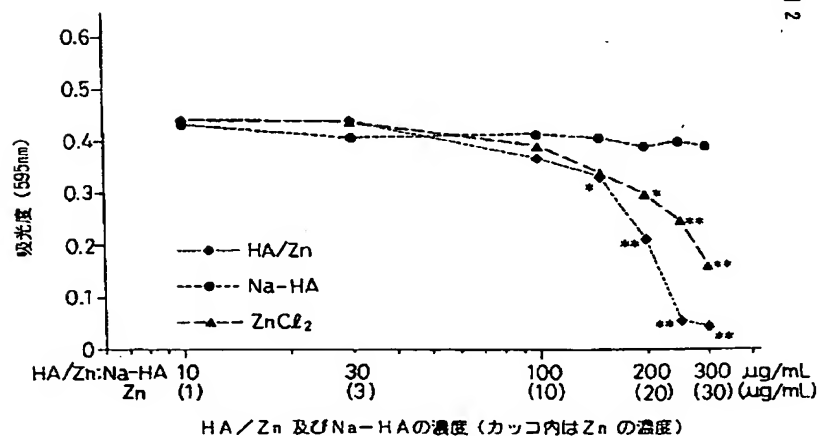
【図2】図2は、変形性関節症患者からの滑膜細胞(OASC)に対する、HA/Zn、Na-HA及びZnの増殖阻害効果を示すグラフである。

10 【図3】図3は、外傷患者からの滑膜細胞(TASC)に対するHA/Zn、Na-HA及びZnの増殖阻害効果を示すグラフである。

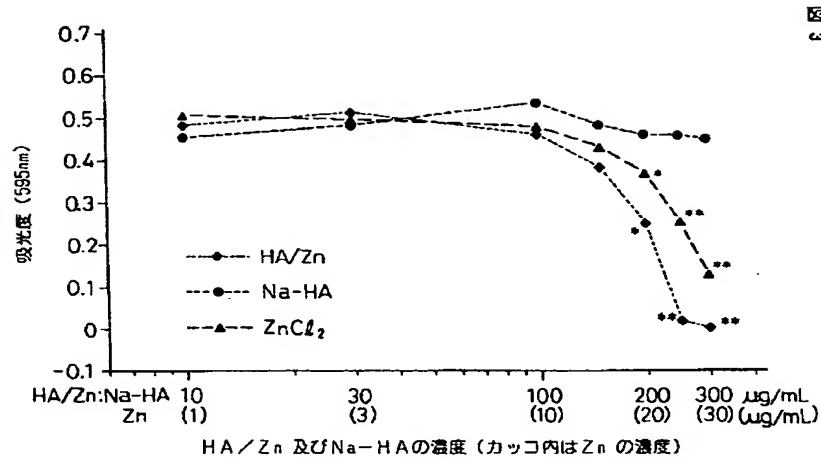
【図1】



【図2】



【図3】



フロントページの続き

(51)Int.Cl. <sup>7</sup>	識別記号	F I	テーマコード* (参考)
A 6 1 P 35/00		A 6 1 K 31/00	6 3 5
43/00			6 4 3 D
A 6 1 K 33/30		33/30	
(72)発明者 前川 敬世		(72)発明者 エリザベート ネスミリイ	
埼玉県上尾市大字上370番地 しらこぼと		ハンガリー国, ブタペスト, 1149, フラ-	
団地25-304		ター ジョルジー29番街	
(72)発明者 ヤノシュ イリエッシュ		F ターム(参考) 4C086 AA01 AA02 EA25 HA03 MA01	
ハンガリー国, ブタペスト, 1112, オルト		MA04 NA05 ZA33 ZA96 ZB15	
27番街		ZB26 ZC20	